

## **BAB 4**

### **METODE PENELITIAN**

#### **4.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental (*true experiment designs*) laboratorium dengan rancangan penelitian *post test only control group design*.

#### **4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang Kampus II pada bulan April 2018.

#### **4.3 Populasi dan Sampel**

##### **4.3.1 Populasi**

Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah seluruh tikus putih *strain wistar* jantan.

##### **4.3.2 Sampel**

Sampel yang digunakan adalah tikus putih *strain wistar* dengan jenis kelamin jantan berusia 2-3 bulan merupakan usia dewasa yang telah sempurna dalam metabolismenya dan berat badan 150-200 gram yaitu berat badan rata-rata tikus putih normal.

##### **4.3.3 Besar Sampel**

Penentuan besar sampel (replikasi) menggunakan rumus Federer, sebagai berikut :

$$(r-1)(t-1) \geq 15$$

$$(r-1)(5-1) \geq 15$$

$$4r-4 \geq 15$$

$$r \geq (15+4)/4$$

$$r \geq 4,75 \sim 5$$

Keterangan:

$r$  = jumlah replikasi tiap perlakuan

$t$  = banyaknya kelompok perlakuan

Banyaknya ulangan pada tiap kelompok perlakuan adalah 5 maka akan diperoleh  $E$  (*resource equation*) yaitu:

$$E = \text{total sampel} - \text{total kelompok perlakuan}$$

$$= (5 \times 5) - 5$$

$$= 20$$

Rumus besar sampel untuk mengantisipasi kemungkinan sampel terpilih mengalami *drop out* (sebanyak 10%), sebagai berikut:

$$n' = 5 / (1 - 0,1)$$

$$n' = 5 / (0,9)$$

$$n' = 5,5 \sim 6$$

Keterangan:

$n'$  = jumlah sampel penelitian

$n$  = besar sampel yang dihitung

$f$  = perkiraan proporsi *drop out*, kira-kira 10% ( $f = 0,1$ )

Jumlah cadangan yang dibutuhkan tiap kelompoknya adalah  $6-5=1$ . Jadi total sampel tikus yang dibutuhkan adalah 25 ekor tikus dibagi ke dalam 5 kelompok yang berarti 1 kelompok terdiri dari 4 ekor tikus dan 1 ekor tikus cadangan.

#### 4.3.4 Teknik Pengambilan Sampel

Teknik pengambilan sampel menggunakan *simple random sampling*.

#### 4.3.5 Karakteristik Sampel Penelitian

##### 1. Kriteria Inklusi

- a. Tikus Putih *Rattus novergicus strain wistar* dengan umur 2-3 bulan.
- b. Berat badan yaitu 150-200 gram
- c. Jenis kelamin jantan.
- d. Sehat, dengan adanya gerakan aktif, bulu tebal, dan dengan warna mata jernih.

##### 2. Kriteria Eksklusi

- a. Tikus yang sudah pernah dijadikan sampel penelitian sebelumnya

##### 3. Kriteria Drop Out

- a. Tikus yang sakit atau mati selama proses penelitian

#### 4.3.6 Variabel Penelitian

##### 4.3.6.1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah dosis ekstrak aseton tomat ceri (0,855 gr/200grBB/hari, 1,71 gr/200grBB/hari, 3,42 gr/200grBB/hari).

#### 4.3.6.2. Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah jumlah sel Leydig pada tikus putih *strain wistar*.

#### 4.3.7 Definisi Operational

Tabel 4.1 Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi Operasional Variabel	Hasil Ukur (Indikator) Variabel	Cara Ukur Variabel	Alat Ukur	Skala Ukur Variabel
1	Ekstrak Aseton Tomat Ceri ( <i>Solanum lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i> )	Ekstrak aseton buah tomat ceri ( <i>Solanum lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i> ) yang diperoleh dari Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang	Dosis I = 0,855gr/200grBB/hari Dosis II = 1,71gr/200grBB/hari Dosis III = 3,42gr/200grBB/hari	Ekstrak bubuk sesuai dosis di larutkan dengan air sampai 3 mL dan diberikan menggunakan sonde setiap pagi selama 14 hari	Timbangan	Kategorik → ordinal
2	Sel Leydig	Sel Leydig pada jaringan interstisial testis dengan ciri-ciri sel dengan diameter 20 $\mu$ m, berukuran lebih besar dibandingkan sel disekitarnya, memiliki inti bulat, dan sitoplasma sel Leydig pucat mengandung tetesan lipid di tepi sitoplasma ( <i>bubbly appearance</i> ) (Ross <i>et al</i> , 2015). Di hitung jumlah sel dalam tubulus seminiferus 10 lapang pandang dengan perbesaran 400x (Anindita, 2012).	Jumlah Sel		Mikroskop cahaya	Numerik → rasio
3	Asap Rokok	Rokok yang peneliti gunakan adalah rokok kretek berkomposisi tar 38 mg dan nikotin 2,2		Setiap kelompok tikus dimasukkan		

mg. Pemaparan asap rokok akan dilakukan selama 14 hari dengan jumlah rokok yaitu 4 batang tiap kelompok per hari. (Sutanto et al, 2017; Rizqi *et al*, 2016).

ke dalam 1 kotak kaca yang sudah di modifikasi, lalu diberi paparan asap rokok. (Sutanto et al, 2017)

#### 4.4 Alat dan Bahan Penelitian

a. Timbangan untuk menimbang berat badan tikus

b. Untuk pemeliharaan tikus:

- Bak tikus
- Penutup kandang dari anyaman kawat
- Botol air
- Sekam
- Bahan pakan
- *Aquadest*

c. Untuk pembuatan dan penyimpanan ekstrak aseton tomat ceri:

- Timbangan
- Lemari pengering
- Lemari pendingin
- Blender
- Buah tomat ceri
- Homogenizer
- Pengering

- Acetone-petroleum ether
- Tabung reaksi
- Natrium klorida
- Kalium karbonat
- Kalsium klorida
- Aluminium foil

d. Untuk pemberian perilaku:

- *Handscoon*
- Kotak modifikasi
- Rokok kretek
- Korek api
- Kotak modifikasi
- Disposable syringe 3 ml
- Jarum sonde
- *Micropipette*

e. Untuk mengamati sediaan

- Mikroskop cahaya
- Sarung tangan karet
- Alat bedah (*scapel*, pinset, gunting, meja, dan jarum)
- Pengait jaringan
- Mikrometer
- Mikroskop

- Mikrotom
  - *Cover glass* dan *object glass*
- f. Untuk perlakuan setelah pengamatan
- Polybag
- g. Label
- h. Bahan untuk membuat preparat histologi testis :
- Eter & kapas untuk membius tikus
  - Paraffin
  - Xilol
  - Hematoxilin Eosin (HE)
  - Aquades
  - Ethanol 70%, 95%, 100%
  - Formalin 10%

#### 4.5 Prosedur Penelitian

##### 4.5.1 Pembagian Kelompok Tikus

Tikus yang digunakan sebanyak 25 ekor, terbagi menjadi lima kelompok dan tiap kelompok terdiri dari lima ekor tikus. Pembagian kelompok sebagai berikut:

1. Kontrol negatif : Kelompok tikus yang tidak diberi perlakuan.  
Hanya diberikan pakan standart dan 1ml aquadest.
2. Kontrol positif : Pemaparan asap rokok sebanyak 4 batang +  
pakan standart dan 1 ml aquadest.

3. Perlakuan 1 : Pemaparan asap rokok sebanyak 4 batang + pakan standart dan 1 ml aquadest + ekstrak aseton tomat ceri 0,85 gr/200grBB/hari yang diberikan setelah pemaparan pada hari yang sama.
4. Perlakuan 2 : Pemaparan asap rokok sebanyak 4 batang + pakan standart dan 1 ml aquadest + ekstrak aseton tomat ceri 1,71 gr/200grBB/hari yang diberikan setelah paparan pada hari yang sama.
5. Perlakuan 3 : Pemaparan asap rokok sebanyak 4 batang + pakan standart dan 1 ml aquadest + ekstrak aseton tomat ceri 3,42 gr/200grBB/hari yang diberikan setelah pemaparan pada hari yang sama.

#### 4.5.2 Aklimatisasi

Proses aklimatisasi atau adaptasi hewan coba dalam kandang selama 7 hari dengan tujuan agar tikus menyesuaikan diri terhadap lingkungan yang baru.

#### 4.5.3 Paparan Asap Rokok

Rokok yang digunakan adalah rokok kretek berkomposisi tar 38 mg dan nikotin 2,2 mg (Rizqi *et al*, 2016). Rokok kretek banyak dikonsumsi masyarakat dan dijual tanpa filter sehingga kandungan tar, nikotin dan karbon monoksida (CO) yang dihasilkan dari asapnya dengan kadar nikotin dan tar yaitu 2-3 kali lebih besar dibanding dibandingkan jenis rokok lainnya (Roemer *et al*, 2014). Pemaparan asap rokok akan dilakukan selama



14 hari dengan jumlah rokok yaitu 4 batang/hari. Selama 14 hari akan terjadi peningkatan stres oksidatif oleh karena paparan asap rokok yang mengakibatkan kerusakan DNA serta apoptosis sel Leydig (Sutanto *et al*, 2017; Dai *et al*, 2015).

Cara pemaparan :

1. Tempat pemaparan berupa kotak yang telah dimodifikasi
2. Satu kelompok tikus dimasukkan kedalam kotak dan ditutup
3. Pada ujung pipa di letakkan rokok kretek
4. Rokok dinyalakan dengan korek api dan dilakukan pemompaan secara manual dengan spuit
5. Pemaparan dilakukan sebanyak 4 batang rokok dalam satu hari
6. Penutup dibuka dan tikus dipindahkan
7. Setelah dilakukannya pemaparan, kotak dan spuit dibersihkan

#### 4.5.4 Penentuan Dosis Ekstrak Tomat Ceri

Penentuan dosis ekstrak aseton tomat ceri didasarkan pada dosis likopen pada manusia. Berdasarkan penelitian Neyestani *et al* dalam Kaulmann *et al*, 2014 menyatakan bahwa bahwa dosis likopen 10 mg/hari pada manusia dapat menurunkan stress oksidatif. Dengan asumsi 1000 gram ekstrak aseton tomat ceri mengandung 105,17 mg likopen, maka dosis ekstrak aseton tomat ceri untuk manusia dewasa adalah  $10/105,17 \times 1000 \text{ gram} = 95,08 \text{ gram/hari}$ .

Dengan menggunakan table konversi Laurence-Bacharach dari manusia dengan berat badan 70 kg dikonversikan pada tikus dengan berat

badan 200 gram didapatkan faktor konversi mencit sebesar 0,018, oleh karena itu dosis untuk tikus *Rattus strain wistar* jantan dengan berat badan 200 gram adalah  $0,018 \times 95,05 \text{ gr/hari} = 1,71 \text{ gr/hari}$ . Pengelompokan perlakuan yang lain, dosis yang digunakan adalah setengah dari dosis 1,71 gr/hari yaitu 0,85 gr/hari dan 2 kali dari dosis 1,71 gr/hari yaitu 3,42 gr/hari. Ekstrak aseton tomat ceri diberikan secara oral dengan cara menyonde langsung. Sehingga pembulatan dosis yang digunakan yaitu :

Dosis I = 0,85 gr/200grBB/hari.

Dosis II = 1,71 gr/200grBB/hari.

Dosis III = 3,42 gr/200grBB/hari.

#### 4.5.5 Pembuatan Ekstak Tomat Ceri

Ekstrak tomat ceri diperoleh dari Laboratorium Biomedik Universitas Muhammadiyah Malang. Buah tomat ceri yang didapatkan dari pasar Belimbing Malang kemudian dipotong dan dihomogenisasi dengan *homogenizer* sampai konsistensi menjadi seperti pasta. Pembuatan bubuk dengan cara tomat ceri dipotong dan didehidrasi dalam *cabinet dryer* (70°C) dengan sirkulasi udara panas dan dilembutkan dengan *grinder*. Sampel dalam bentuk bubuk kemudian diekstraksi dengan 10 ml *acetone petroleum eter*. Lapisan atas ekstrak yang mengandung likopen organik diambil dengan pipet dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Ekstraksi dilakukan berulang, kemudian ekstrak digabungkan, dicuci dengan 15 ml natrium klorida cair jenuh (NaCl) dan dibuang sisa cairannya dengan mikropipet. Ekstrak dicuci dengan 10 mL 10% kalium karbonat cair

(K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) dan dibuang sisa cairannya. Lapisan organik yang mengandung likopen dikeringkan dengan zat pengering (kalsium klorida). Kelebihan pelarutnya dibiarkan menguap pada suhu kamar selama beberapa menit di ruangan gelap. Tabung berisi ekstrak likopen ditutup dengan aluminium foil dan disimpan dalam *freezer* sampai analisis lebih lanjut.

#### 4.5.6 Pemberian Ekstak Tomat Ceri

Ekstrak aseton tomat ceri dengan berbagai macam dosis, kemudian diberikan secara oral menggunakan sonde setiap hari selama 14 hari.

#### 4.5.7 Pengambilan Testis

Setelah dilakukan penelitian hingga hari terakhir, tikus dimasukkan kedalam tabung yang sebelumnya berisi kapas yang dibasahi *ether* dengan tujuan untuk membius tikus (anastesi). Setelah itu, dilakukan proses pembedahan dengan cara diletakkan dipermukaan dorsal kemudian menjepit bagian bawah perut dengan forsep. Potong kulit dan otot perut dengan gunting, membuat garis longitudinal anterior dan potong kulit skrotum dengan hati-hati untuk mendapatkan testis, dipermukaan testis terdapat saluran melingkar yang disebut epididimis. Selanjutnya dilakukan pembuatan preparat histopatologi yang diperoleh dari Laboratorium Biomedik Universitas Muhammadiyah Malang.

#### 4.5.8 Proses Preparat Histopatologi

##### 1. Pembedahan dan fiksasi

Tikus dibedah untuk mendapatkan testis tikus kemudian mencuci testis tikus dengan larutan NaCl. Organ testis di fiksasi

dengan menggunakan formalin 10% dan di fiksasi selama 24 jam pada container fiksatif.

## 2. Dehidrasi

Lakukan dehidrasi secara bertahap dengan menggunakan etanol 70% selama 1 jam, etanol 95% dan 100% masing masing 1 jam dua kali. Dilanjutkan dengan proses *clearing* dengan pelarut parafin (xilena) selama 1 jam sebanyak 2 kali. Kemudian infiltrasi paraffin dilakukan dalam suhu 56°C-57°C lalu dimasukkan ke dalam paraffin selama 1 jam sebanyak dua kali.

## 3. Embedding

Setelah di infiltrasi paraffin, jaringan dipindahkan dari *embedding cassettes* ke dalam *base mold* yang berisi paraffin cair dan diletakkan di permukaan pendingin selama 15 menit hingga paraffin membeku. Blok paraffin yang telah jadi disimpan di suhu kamar hingga proses *sectioning*.

## 4. Sectioning

Blok paraffin dipotong 4-5 mikron lalu dipilih kualitas terbaik pada bagian lembar jaringan yang sangat tipis. Setelah dipotong menggunakan mikrotom, lembaran jaringan dipindahkan ke dalam *water bath* dengan suhu 45°C untuk menghilangkan kerutan pada lembaran jaringan. Kemudian letakkan di tengah slide, biarkan mengering dengan memasukkan

ke dalam oven termostatik laboratorium dengan suhu 37°C selama 24 jam.

## 5. Staining

Paraffin yang tidak memiliki warna tidak bisa dievaluasi secara mikroskopis sehingga perlu dilakukan pewarnaan Hematoxylin & Eosin (HE). Sebelumnya dilakukan rehidrasi untuk menghilangkan paraffin menggunakan xilol, alkohol, aquades, hematoxylin dan eosin secara berurutan.

## 6. Mounting

Setelah proses staining, slide di letakkan di atas tissue pada permukaan datar. Teteskan 2-3 tetes larutan *mounting medium* seperti *Eukitt* kemudian ditutup dengan cover glass dan dikeringkan selama 24 jam pada suhu kamar.

### 4.5.9 Tahap penghitungan jumlah sel Leydig

Menghitung jumlah sel Leydig menggunakan mikroskop di seluruh lapang pandang di kompartemen intersisial dengan ciri-ciri sel berukuran lebih besar dibandingkan sel disekitarnya, memiliki inti bulat dan sitoplasma sel Leydig pucat mengandung tetesan lipid di tepi sitoplasma (Ross *et al*, 2015). Perhitungan jumlah sel Leydig dilakukan dengan cara menghitung jumlah sel yang ada di dalam tubulus seminiferus dalam 10 lapang pandang dengan perbesaran 400x (Anindita, 2012).

#### 4.5.10 Penguburan Tikus

Tikus dikumpulkan pada kotak kayu berukuran 30 x 20 x 20 cm untuk kemudian dikuburkan di lokasi khusus pemakaman tikus disamping Laboratorium Anatomi Universitas Muhammadiyah Malang.

#### 4. 6 Analisis Data

Analisis data yang digunakan pada penelitian ini adalah uji *one way* ANOVA. Uji dipilih karena penelitian ini menggunakan skala numerik, tidak berpasangan dan  $> 2$  kelompok. Jika nilai  $p < 0,01$  maka hipotesis diterima. Uji ini digunakan untuk mengetahui adanya efek antioksidan dalam berbagai dosis ekstrak aseton tomat ceri terhadap jumlah sel Leydig tikus putih jantan (*rattus novergicus strain wistar*).

Syarat yang harus dipenuhi dalam melakukan uji *one way* ANOVA (untuk  $> 2$  kelompok) adalah:

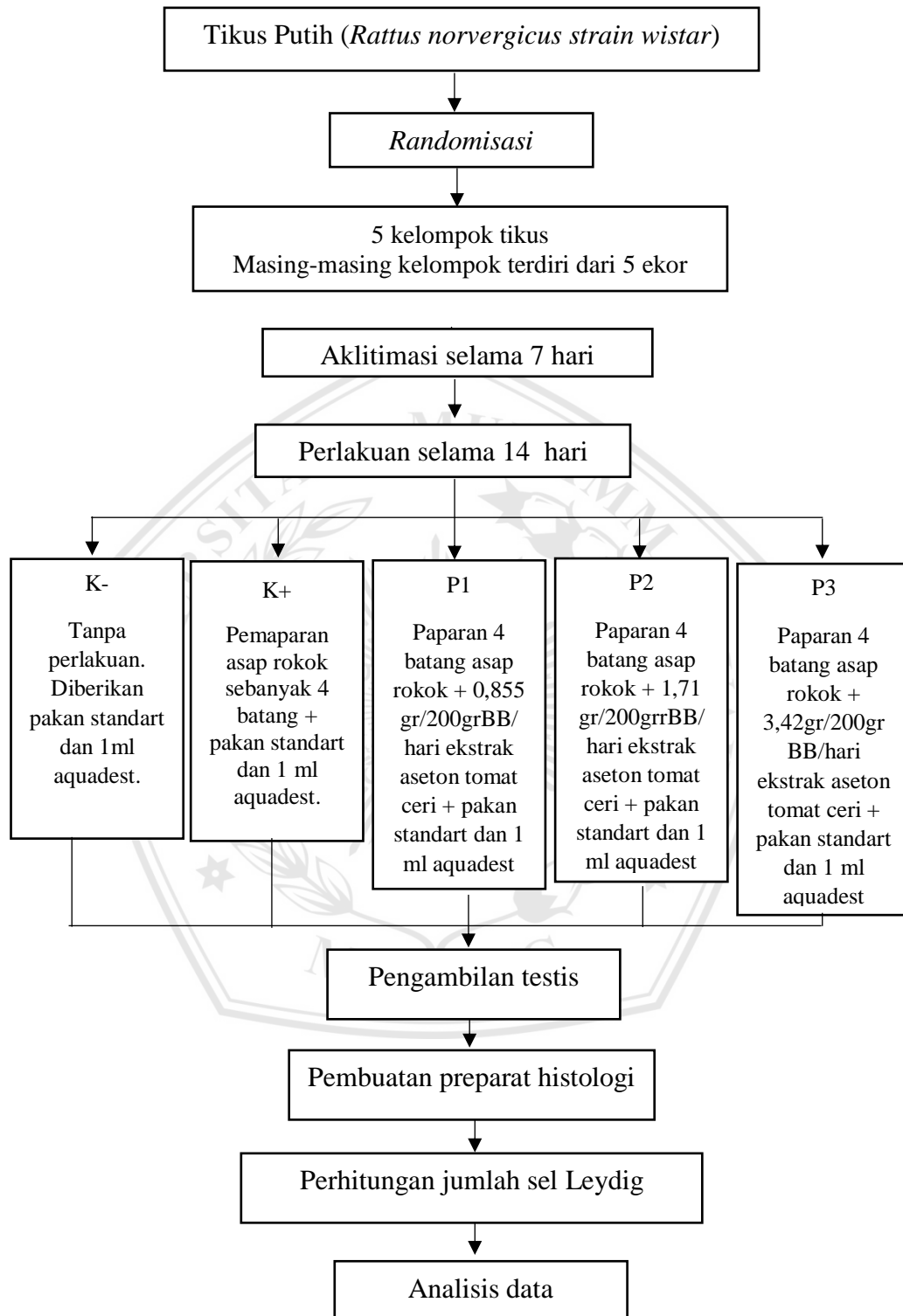
1. Distribusi data harus normal ( $p > 0,05$ ), pada penelitian ini dilakukan uji normalitas menggunakan uji *Shapiro-Wilk* untuk mengetahui apakah kelompok data penelitian berasal dari populasi berdistribusi normal atau tidak normal. Jika distribusi data tidak normal, maka diupayakan untuk melakukan transformasi data supaya data menjadi normal.
2. Varian data harus sama dan homogen ( $p > 0,05$ ), yang dapat diketahui dari uji homogenitas *Levene*. Jika varian data tidak sama atau homogen, maka diupayakan untuk melakukan

transformasi data supaya ragam data menjadi sama atau homogen.

Apabila data berdistribusi normal dan varian sama dapat dilakukan uji *one way ANOVA* lalu dilanjutkan uji *Post Hoc Bonferroni* untuk mengetahui pada kelompok mana terdapat perbedaan yang bermakna. Jika data berdistribusi normal tetapi varian data tidak homogen dilakukan uji *Post Hoc Games-Howell* atau *Tamhane* dan bila data hasil transformasi tidak terdistribusi normal atau ragam data tidak sama maka dipilih uji non parametrik yaitu *Kruskal-Wallis* sebagai alternatifnya dan dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Mann-Whitney* untuk menentukan pada dosis mana yang memiliki hasil yang bermakna.

Selanjutnya dilakukan uji regresi linear, yang digunakan dengan tujuan untuk mengetahui seberapa besar dan memprediksi pengaruh pemberian ekstrak aseton tomat ceri terhadap jumlah sel Leydig tikus putih jantan (*rattus novergicus strain wistar*) (Dahlan, 2015).

## 4. 7 Alur Penelitian



Gambar 4.1  
Diagram Alur Penelitian